

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-505097

(P2001-505097A)

(43) 公表日 平成13年4月17日 (2001.4.17)

| (51) Int.Cl. ⁷ | 識別記号 | F I | テーマコード* (参考) |
|---------------------------|-------|----------------|--------------|
| A 6 1 L 27/00 | Z N A | A 6 1 L 27/00 | Z N A G |
| C 0 7 K 14/495 | | C 0 7 K 14/495 | |
| 19/00 | | 19/00 | |
| C 1 2 N 15/09 | | C 1 2 N 15/00 | A |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願平10-523215
(86) (22) 出願日 平成9年11月19日 (1997.11.19)
(85) 翻訳文提出日 平成11年5月19日 (1999.5.19)
(86) 国際出願番号 P C T / E P 9 7 / 0 6 4 6 3
(87) 国際公開番号 W O 9 8 / 2 1 9 7 2
(87) 国際公開日 平成10年5月28日 (1998.5.28)
(31) 優先権主張番号 1 9 6 4 7 8 5 3 . 7
(32) 優先日 平成8年11月19日 (1996.11.19)
(33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(71) 出願人 バイオファーム ゲセルシャフト ツァー
ル バイオテクノロジーシェン エントヴ
イックラング フォン ファルマカ エム
ペーハー
ドイツ連邦共和国 ディー—69115 ハイ
デルベルグ, ツェルニリング 22
(71) 出願人 ゲロントカレ ゲーエムペーハー
ドイツ連邦共和国 ディー—64354 ライ
ンハイム, ロスベルグリング 107, バイ
オマテリアルズ アンド メディカル デ
ィバイシズ
(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良された軟骨誘導活性および/または硬骨誘導活性を有する複合体

(57) 【要約】

本発明は、軟骨誘導活性および/または硬骨誘導活性を有し、2つの成分AおよびBを含有する生体活性移植体材料に関し、Aは、硬骨誘導性および/または軟骨誘導性のタンパク質もしくはタンパク質混合物(好ましくは、TGF-βスーパーファミリー由来の1種もしくは数種のタンパク質、好ましくはMP52)またはこれらをコードするDNA配列であり、Bは、連続ミクロ細孔を有しかつ既に単独で骨誘導性を備えたリン酸カルシウムセラミックスを含んでなる担体マトリックスである。本発明はまた、これらの複合体の製造、ならびに軟骨および/または硬骨に悪影響を及ぼす疾患の治療、更には軟骨および/または硬骨組織に対する損傷の治療のための該複合体の使用に関する。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

1. 軟骨形成活性および／または硬骨形成活性を有し、2つの成分AおよびBを含有する骨交換用生体活性移植体材料であって、

Aは、骨形成誘発性のタンパク質もしくはタンパク質混合物または1種もしくは数種の該タンパク質をコードするDNAであり、B上に適用され、Bは、内因性骨形成活性を有するリン酸カルシウムを含んでなるマトリックス材料である前記移植体材料。

2. 前記成分Aが、軟骨誘導活性および／または硬骨誘導活性を有するTGF- β スーパーファミリーの1種または数種のホモ二量体タンパク質またはヘテロ二量体タンパク質、好ましくはGDFもしくはBMPファミリーまたはそれらの断片の1種または数種のホモ二量体タンパク質またはヘテロ二量体タンパク質、あるいはそれらをコードするDNA配列を含む請求項1記載の移植体材料。

3. 前記成分Aが、

(a)配列番号1に示されるタンパク質配列の成熟部分と、場合により、更に、機能性部分とを含有し、

(b)本質的に同じ活性を有する(a)の成熟部分の一部分、特に改質N-末端を有する

成熟タンパク質を含有し、

(c)他の脊椎動物に由来するタンパク質を起源としている点が配列番号1とは異なるが、本質的に同じ活性を有する、(a)または(b)に対応する部分を含有し

(d)(a)、(b)、または(c)の成熟タンパク質の一部分を含有するとともに、TGF- β スーパーファミリーに由来する他のタンパク質の一部分を融合タンパク質の形態で含有し、

(e)(a)～(d)の単量体成熟タンパク質を含有するとともに、TGF- β スーパーファミリー由来の他のタンパク質の単量体を、ヘテロ二量体を形成して含有し、

(f)(a)～(e)の二量体成熟タンパク質を含有するとともに、TGF- β スーパーファミリー由来の他のタンパク質の二量体を少なくとも1種含有する、

請求項1または2記載の移植体材料。

4. 前記Bが、リン酸三カルシウムセラミックスを含有する生分解性または／および生体活性担体マトリックスであり、該リン酸三カルシウムセラミックスが、その体積の20～60%の範囲で連続マイクロ細孔を有する結晶学的に相純粋な α -または β -リン酸三カルシウムセラミックスを含み、かつそれ単独で既に骨誘導性を備えている請求項1～3のいずれか1項に記載の移植体材料。

5. 前記Bが、10～40 μ mの範囲の一次粒子サイズを有する結晶学的に相純粋な α -または β -リン酸三カルシウムセラミックスを含有する生分解性または／および生体活性担体マトリックスであり、水、血清、血漿、および血液のような好適な液体中に医療用として好適な懸濁液の形態で存在することにより、移植体中への巨大細胞または結合組織の浸潤は起こらない請求項4記載の移植体材料。

6. 注入可能な懸濁液の形態で存在する請求項4または5記載の移植体材料。

7. 前記Bが、骨貯蔵部においてBが化学的分解を起こす程度まで遅延制御されてAを放出(制御放出)する結晶学的に相純粋な α -または β -リン酸三カルシウムセラミックスを含有する生分解性および生体活性担体マトリックスである請求項4, 5, または6記載の移植体材料。

8. 前記タンパク質またはDNA配列Aが、生理学的に許容しうる水混和性溶剤または適切な溶剤混合物の溶液として、Aがマトリックスのマイクロ細孔構造の中および／または上に均一に分布するように生体適合性マトリックスBのマイクロ細孔構造中に適用される請求項1～7のいずれか1項に記載の生体活性移植体材料の製造方法。

9. 前記溶剤または溶剤混合物が、昇華により、好ましくは凍結乾燥により除去される請求項8記載の複合体の製造方法。

10. 好ましくは水またはエタノールである沈殿溶剤を添加して、溶剤から前記マトリックスB中にin situで沈殿させることにより、前記タンパク質またはDNA配列Aを濃縮する請求項8記載の複合体の製造方法。

11. 請求項1～7のいずれか1項に記載の移植体材料を、場合により、薬学的にも生理学的にも許容しうる補助物質、希釈剤、および／または充填剤と共に含んでなる医薬組成物。

12. 軟骨および／または硬骨に悪影響を及ぼす疾患の局所治療、または／お

よび怪我、手術、退化、または過労によって生じる軟骨および／または硬骨組織に対する損傷の局所治療を行うための、請求項1～7のいずれか1項に記載の生体活性移植体材料または請求項11に記載の医薬組成物の使用。

13. 歯周病、サイナスリフト、顎域における嚢胞充填、骨折、骨交換のような骨欠損の治療、ならびに美容および形成外科における利用、および可動骨部分の固定のための、請求項1～7のいずれか1項に記載の生体活性移植体材料または請求項11に記載の医薬組成物の使用。

【発明の詳細な説明】

改良された軟骨誘導活性および／または硬骨誘導活性を有する複合体

説明

本発明は、TGF- β ファミリーのうちの1種もしくは数種のメンバー(好ましくは、MP52)またはそれをコードするDNA配列を含み軟骨誘導活性および／または硬骨誘導活性を有する新しい改良された複合体、ならびに結晶学的に相純粋な(p hasc-pure)リン酸三カルシウムを含む特別な担体マトリックスに関する。本発明は更に、これらの複合体の製造、ならびに軟骨および／または硬骨に影響を及ぼす疾患の治療および軟骨および／または硬骨組織に対する損傷の治療のためのこれらの使用に関する。

TGF- β スーパーファミリーに由来する多くの増殖因子は、広範にわたる治療方法および特に創傷の治癒および組織の再構成に関連した用途に適用される。TGF- β スーパーファミリーのメンバーに関するレビューについては、例えば、Robert s, A.B. & Sporn, M.B. Handbook of Experimental Pharmacology 95 (1990) 419-472; Kingsley, D.M., Genes & Development 8 (1994) 133-146およびそれらの中で引用されている文献を参照されたい。このメンバーとしては、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、およびTGF- β 5のようなTGF- β タンパク質が挙げられるが、これについては、例えば、米国特許第5,284,763号; 欧州特許第0 376785号; 米国特許第4,886,747号; Madisen, L. et al., DNA 7 (1988) 1-8; Derynck, R. et al., EMBO J. 7 (1988) 3737-3743; Jakowlew, S.B. et al., Mol. Endo. 2 (1988) 1186-1195; Kondaiah, P. et al., J. Biol. Chem. 265 (1990) 1089-1093を参照されたい。周知のアクチビン鎖 β A、 β B、 β C、および β Dを有するアクチビン／インヒビンは更なるスーパーファミリーを形成する。これについては、例えば、Mason, A.J. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 135 (1986) 957-964; Hotten, G. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 206 (1995) 608-613; Oda, S. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 210 (1995) 581-588を参照されたい。GDF-12もまた、アミノ酸相同性があるためにこのスーパーファミリーに分類することがで

きる(WO 96/02559号を参照されたい)。β Aおよびβ Bはまた、ホモ二量体のほかにヘテロ二量体β A β Bを形成することができる。αサブユニットと組み合わせると、アクチビンと比べて本質的に反対の活性を有するインヒビンが生成する。これについては、Vale, W. et al., Handbook of Experimental Pharmacology 95 (1990) 211-248; Vale, W. et al., The Physiology of Reproduction, Raven Press, New York (1994) 1861-1878を参照されたい。BMP(骨形態形成タンパク質)ファミリーのメンバーは、タンパク質BMP-2(BMP-2a)、BMP-3、BMP-3b、BMP-4(BMP-2b)、BMP-5、BMP-6、BMP-7(OP-1)、BMP-8(OP-2)、BMP-9、BMP-10、BMP-11、BMP-12、およびBMP-13を含む更なるサブファミリーを形成する。これについては、例えば、Wozney, J.M. et al. Science 242 (1988) 1528-1534; Celeste, A.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 9843-9847; Ozkaynak, E. et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 25220-25227; Takao et al. Biochem. Biophys. Res. Com. 219 (1996) 656-662; WO 93/00432; WO94/26893号; WO 94/26892号、およびWO 95/16035号を参照されたい。更なるサブグループは、GDF-1、GDF-3、GDF-9、GDF-10、GDF-11、ならびに軟骨誘導および/または硬骨誘導に関連して特に興味を持たれるGDF-5、GDF-6、およびGDF-7を含むGDF(増殖分化因子)ファミリーである。これについては、McPherron, A.C. & Lee, S.-J., J. Biol. Chem. 268 (1993) 3444-3449; Storm, E.E. et al., Nature 368 (1994) 639-643; Lee, S.-J, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 4250-4254; Cunningham et al. Growth Factors 12(1995), 99-109; Hotten, G. et al., Growth Factors 13 (1996) 65-74; Chang, S.C. et al., J. Biol. Chem. 269 (1994) 28227-28234を参照されたい。アミノ酸の相同性に起因してGDFファミリーおよびBMPファミリーのサブグループ間にいくらかの重なりが見られる。また、シヨウジョウバエ由来のTGF-βスーパーファミリーのメンバーdppおよび60Aに対して軟骨誘導能および硬骨誘導能を検出することが可能であった。これについては、Sampath, T.K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6004-6008を参照されたい。タンパク質ドーサリンおよび骨形成誘発タンパク質もまた興味深い。これについては、Basler, K. et al., Cell 73 (1993) 687-702; WO 94/01557号を参照されたい。種々のメンバーのヘテロ二量体についての報告もなされてい

るが、これについては、Aono, A. et al.,

Biochem. Biophys. Res. Commun. 210 (1995) 670-677; WO 93/09229号; 欧州特許第0 626 451号を参照されたい。特に、TGF- β ファミリー、BMPファミリーおよびGDFファミリーのサブファミリーに属する多くメンバーは、軟骨誘導能および/または硬骨誘導能を有し、アクチビンファミリーのメンバーもまた、少なくとも他のTGF- β スーパーファミリーのメンバーと併用されると骨の形成に影響を与えることができる。これについては、例えば、Hock, J.M. et al., Endocrinol. 126 (1990) 421-426; Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990) 2220-2224; Wozney et al., Mol. Reprod. Dev. 32 (1992) 160-167; Sampath et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 20352-20362; Ogawa, Y. et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 14233-14237; WO 88/00205号; 米国特許第5,013,649号; WO 89/10409号; WO 90/11366号; WO 91/05802号; WO 92/15323号; WO 91/18098号; WO93/00432号; WO 93/09229号; WO 94/01557号; WO 94/26893号; WO 94/26892号; WO 94/15949号; WO 95/01801号; WO 95/01802号; および欧州特許第0 626 451号を参照されたい。個々のタンパク質の中には軟骨および硬骨の誘導の過程で異なる部位で作用するものがあるため、このようなタンパク質をいろいろと組み合わせることが軟骨および骨の誘導の効率を高めるうえで有利であろうと推定できる。このようなタンパク質の混合物もまた、本発明に含まれる。

TGF- β ファミリーのタンパク質(すなわち、MP52およびMP121)に対するDNA配列およびタンパク質配列については、WO 93/16099号、WO 95/04819号、およびWO 96/01316号に記載されている。MP121は、既に上述したアクチビン β Cである。軟骨誘導能および硬骨誘導能が既に判明しているMP52(出版物の中ではGDF5と呼ばれることもある)は、特に興味深い(WO 95/04819号およびHotten et al. Growth Factors 13 (1996) 65-74)。

軟骨誘導能および/または硬骨誘導能を有するTGF- β スーパーファミリーのメンバーは、成熟部分においてアミノ酸の類似性が高いことにより特性付けられ、TGF- β スーパーファミリーのメンバーに特有な7個の保存システインを有する。このスーパーファミリーのメンバーの活性形態は、一般的には常に、ホモ二量体

および／またはヘテロ二量体のタンパク質である。これらのタンパク質の軟骨誘導能および／または硬骨誘導能は、通常、それ自体では軟骨誘導能および／また

は硬骨誘導能がまったくない不活性な担体マトリックス上で試験される。

既に1960年代において移植可能な骨代替物としてリン酸カルシウムセラミックスの利用が開始された(Bhaskar et al., Oral Surg. 32 (1971) 47)。これは、このグループの複合体が骨の無機質成分に化学的に類似することに基づくものであった。化学的および物質的パラメータと生物学的性質との関係についての最初の系統立った研究は、1970年代初頭にBattelle Instituteで行われた(Heide, Koster et al., Z. Orthop. 118 (1979) 398およびBiotechn. Umschau 2 (1978) 226)。これらの研究では、種々の $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ 比を有するリン酸カルシウムが、焼結法によって粒状またはペレット状のセラミック移植体材料として生成され、動物実験で試験された。これらの研究の主な結果は、次のようにまとめることができる。

- (a) 特定の組成のリン酸カルシウムセラミックスは、優れた骨組織耐性により特性付けられる。
- (b) 最適組織耐性は、主に、 $3/1$ の $\text{CaO}/\text{P}_2\text{O}_5$ 比を有するセラミックス、すなわち、リン酸三カルシウムTCP、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (または、セラミックス式として $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ と書かれる)と、合成的に調製可能なヒドロキシルアパタイト(HA)そのものの、すなわち、 $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$ とを用いて達成される。この結果は理にかなったものである。なぜなら、最も重要な無機質成分であるヒドロキシルアパタイトを含む骨の無機質成分の組成は、ほぼこの比に対応するからである。TCPとHAは類似の化学組成を有するが、溶解性ならびに他の物理的性質(例えば、密度および強度)はかなり異なる。適用可能性を有する分野は、もちろん、この点にも依存する。
- (c) リン酸三カルシウムTCPの2種の最適生分解性改質体(すなわち、準安定な高温改質体 α -TCPおよび特に、安定な低温改質体 β -TCP)ならびにヒドロキシルアパタイトHAは、ある程度の生分解性を有する。すなわち、生体内に貯蔵されている間に、ある程度迅速に分解または吸収される。Ramselaar et al.

1., J. Materials Sci. 2 (1991) 63によれば、 α -TCPおよび β -TCPは顕著な生分解性を有する。HAの吸収は、生体環境では非常に少ない。Schuster, Heideらによる放射線標識された移植体材料を用いた実験(Battelle Institute Frankfurtの未発表報告)によれば、骨に貯蔵されているTCPは化学的に分解される

傾向を呈する。すなわち、分解および分解された産物の代謝は、骨破壊細胞(bone-degrading cell)が関与せずに行われるが、ヒドロキシルアパタイトの非常にゆっくりとした吸収は、骨破壊細胞(破骨細胞)の特異的な作用により依存したものである。

(d) TCPおよびHAをベースとした生体適合性リン酸カルシウムセラミックスは、特に前述のBattelleのワーキンググループにより1970年代に動物実験で印象的に示された結合組織による被包をほとんど伴うことなく骨貯蔵部に一体化される。その時に、この卓越した性質に対して「生体活性」という用語が導入された。

有望なリン酸カルシウムセラミックスの更なる開発中に、 $\text{CaO-P}_2\text{O}_5(+\text{H}_2\text{O})$ 系の複雑な結晶と化学との関連についての詳細な知識が系統立った最適化を行うための絶対的な前提条件であることが分かった。残念ながら、以前および現在においても、生分解性に乏しいHAをベースとした材料を、例えば、歯周ポケットの衛生管理のような典型的な一時的用途に使用する場合には特に、こうした前提条件を無視するユーザーが多い。この課題に関する重要な論文が、De Groot et al., *Biomaterials* 1 (1980) 47およびBauer and Hohenberger, "Berichte der DKG" 66 (1989) 23に発表されている。

最近でも今まで通り普通に市場で入手できる多数の移植体材料には、TCP相とHA相と他のリン酸カルシウム相(例えば、リン酸二カルシウムまたはリン酸四カルシウム、およびリン酸カルシウムガラス)との未だにはっきりしない混合物が含まれているが、こうした移植体材料は、結合組織浸潤の誘発、炎症反応に伴って生じる可能性のあるマクロファージの活性化など、有害な生物医学的性質をもっている。このような欠陥のある組成を有する材料で結合組織を被包すると、移植

体に対する拒絶反応が現れる(Bauer and Hohenberger, "Berichte der DKG" 66 (1989) 23)。理論的組成だけが非生理的外来相の存在に対する判定基準になるわけではない。これらの結果を考慮すると、使用する移植体材料は結晶学的な相純度をもたなければならないことが分かる。

2つの主要なタイプのリン酸カルシウム、すなわち、リン酸三カルシウム(TCP)およびヒドロキシルアパタイト(HA)は、それらの吸収の差異に対応して適用

領域が異なる。骨の再生(顎領域の嚢胞の充填、疾患もしくは手術によって生じた骨の欠陥または退行性の骨の欠陥の充填)と同時に生体材料が吸収される時間的経過をとる場合、TCPは一時的な骨代替物として特に有利である。これとは対照的に、HAは、例えば、ストレスの加わった骨貯蔵部と金属材料または他の不活性材料との直接的な接触を回避することが望まれる関節内補綴材のコーティングと関係させて長期にわたる骨の交換を行うのに好ましいと考えられる。

本発明の目的は、哺乳類、特に、ヒトなどの霊長類において特に高い軟骨誘導活性および/または硬骨誘導活性を呈し、しかもこれまでに使用されてきた材料の欠点をもたないかもっていても極わずかである新しい複合体を提供することである。このような複合体は、軟骨および/または硬骨に悪影響を及ぼす疾患、特に、骨形成物質の欠損、および/または軟骨および/または硬骨組織に対する損傷に関連した疾患の治療過程を大きく促進するはずである。

この目的は、軟骨形成活性および/または硬骨形成活性を有する骨交換用の生体活性移植体材料により本発明に従って達成される。この材料には、2つの成分AおよびBが含まれる。成分Aとしては、軟骨誘導性および/または硬骨誘導性のタンパク質またはタンパク質混合物あるいはこうしたタンパク質またはタンパク質混合物をコードするDNAが含まれ、成分Bとしては、内因性骨形成活性をもたないリン酸カルシウムを含有するマトリックス材料が含まれ、AはBに適用される。本発明の好ましい実施態様は、サブクレーム中に記されている。特に、2つの成分AおよびBを含む材料が提供される。Aは、軟骨誘導活性および/または硬骨誘導活性を有するTGF- β スーパーファミリーに由来する1種または数種のホモ二量体またはヘテロ二量体タンパク質を含むタンパク質またはタンパク質

混合物を表し、Bは、好ましくは生分解性骨セラミックス、特に好ましくは α -または β -リン酸三カルシウムセラミックスを含む骨形成誘発性担体マトリックスを表す。Aは、共有結合することなくBと結びついており、例えば、骨貯蔵部においてBが化学的分解を起こす程度まで骨形成過程にBからゆっくりとAを放出させることができる。従って、Aに対していわゆる制御放出が行われることになる。

このほか、Aはまた、上記のタンパク質またはタンパク質混合物をコードする

DNAを表すこともできる。場合により、DNAが変性しないように、当業者に周知の方法によって保護することもできる。周囲の組織中への放出の後、このようなDNAは、そこに存在する細胞または担体マトリックス中に移動した細胞によって摂取され、発現し、発現されたタンパク質またはタンパク質混合物は活性物質として作用することができる。

従って、DNAは、好ましくは発現の誘発または促進を行う配列と関連づけられる。発現は、特に、細胞ゲノム中に特異的な組換えを導入することにより、すなわち、細胞の配列の制御下でタンパク質の産生を引き起こす部位に導入することにより促進させることができる。

一方、DNAはまた、好適な発現ベクター上で使用することもできる。

「軟骨誘導活性および／または硬骨誘導活性を有するTGF- β スーパーファミリーのタンパク質」という用語は、その成熟部分中に特徴的な7個の保存システインが含まれるタンパク質を意味する。これには、TGF- β のメンバー、アクチビン、BMPおよびGDFファミリー、特にMP52、ならびに基本的に同一の活性を有するそれらの断片が含まれる。対応するヌクレオチドおよびタンパク質の配列は、前述の引用文献中に記載されている。こうした文献中の開示内容は、本明細書に含まれるものとする。好ましくは、これらの物質としては、上記のタンパク質のホモ二量体、更に、種々のファミリーメンバーのヘテロ二量体が挙げられる。好ましくは、BMPファミリーおよび／またはGDFファミリーのメンバー、特にMP52と同じレセプター機構および／または同じシグナル伝達を有するタンパク質が含まれる。これにはまた、軟骨誘導活性および／または硬骨誘導活性を有するTGF- β ス

ーバーファミリーに由来する種々のタンパク質の組合せが含まれる。軟骨誘導能および／または硬骨誘導能は、周知の実験で試験することができる。例えば、*in vivo*では、ラットの筋肉組織中に好適な担体マトリックスと共にタンパク質を移植した後、軟骨および／または硬骨を誘導することによって(例えば、Sampath, T.K. et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 20352-20362を参照されたい)、および／または*in vitro*では、ROB-C26細胞(Yamaguchi, A. et al., J. Cell Biol. 113 (1991) 681-687を参照されたい)および／またはW-20-17細胞(Thies, R.S. et al. Endocrinol. 130 (1992) 1318-1324を参照されたい)においてアルカリ

性ホスファターゼ活性を誘発することによって、および／または細胞外マトリックスのタンパク質の発現を刺激することによって(Hock, J.M. et al. Endocrinol. 126 (1990) 421-426を参照されたい)、および／またはChen, P. et al., Exp. Cell Res. 195 (1991) 509-515および／またはVukicevic, S., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 8793-8797に記載の実験で試験することができる。タンパク質は、成熟タンパク質として存在していてもよいし、更には、前駆体タンパク質として、すなわちプロペプチド部分が様々な方法で処理されたタンパク質および／または生体活性に本質的な影響を与えない追加のまたは改質されたN-末端および／またはC-末端アミノ酸配列を有するタンパク質として存在していてもよい。

一方、成熟タンパク質またはその断片をコードする部分のほかに、更に、特に、TGF- β スーパーファミリーの他のタンパク質、更にまた、アクチビン、BMP、およびGDFタンパク質の機能性シグナルまたは／およびプロペプチド部分を含有する融合タンパク質も利用可能である。対応するヌクレオチドおよびタンパク質の配列は、前述の引用文献中に記載されている。こうした文献中の開示内容は、本明細書に含まれるものとする。成熟タンパク質に対する正確なリーディングフレームを保持することが重要である。この場合、例えば、プロペプチド部分を他のタンパク質の対応する部分で置き換えるが、これについては、Mol. Endocrinol. 5(1991), 149-155およびProc. Natl. Acad. Sci. USA 90(1993), 2905-2909に記載されている。

本発明の複合体中のタンパク質または該複合体によりコードされるタンパク質には、置換または挿入されたアミノ酸が含まれていてもよく、あるいは欠損があってもよいが、この場合にもまた、活性が有意な影響を受けてはならない。これらのタンパク質は、ヒト、マウス、ラット、ウシ、またはブタのような様々な種から単離することができる。更に、当該技術分野で周知の方法、例えば、グリコシル化、リン酸化、硫酸化、および脂肪とのエステル化によってタンパク質を改質することもできるが、この場合にもまた、これにより活性に有意な変化を生じてはならない。

本発明の好ましい実施態様において、Aは、GDFもしくはBMPファミリーに由来するタンパク質またはそれらの断片である。

本発明の特に好ましい実施態様において、成分Aは、

- (a)配列番号1に示されるタンパク質配列の成熟部分と、場合により、更に、機能性部分とを含有し、
 - (b)本質的に同じ活性を有する(a)の成熟部分の一部分、特に改質N-末端を有する成熟タンパク質を含有し、
 - (c)他の脊椎動物に由来するタンパク質を起源としている点が配列番号1とは異なるが、本質的に同じ活性を有する、(a)または(b)に対応する部分を含有し、
 - (d)(a)、(b)、または(c)の成熟タンパク質の一部分を含有するとともに、TGF- β スーパーファミリーに由来する他のタンパク質の一部分を融合タンパク質の形態で含有し、
 - (e)(a)~(d)の単量体成熟タンパク質を含有するとともに、TGF- β スーパーファミリー由来の他のタンパク質の単量体を、ヘテロ二量体を形成して含有し、
 - (f)(a)~(e)の二量体成熟タンパク質を含有するとともに、TGF- β スーパーファミリー由来の他のタンパク質の二量体を少なくとも1種含有する、
- タンパク質によって特性付けられる。

この実施態様では特に、成熟タンパク質MP52またはその機能性部分もしくは断片が含まれ、この場合の活性形態は、好ましくは二量体として存在する。7個の保存システインの領域を少なくとも含有する機能性領域またはセクションまたは

断片が特に好ましい。

「生体適合性」および「生体活性」担体マトリックスとは、骨形成の観点から、結合組織被包、炎症、および組織退化のような生体組織反応に損傷を与えることなく骨中に一体化できると同時に、移植体の表面構造上または表面構造中における骨の直接的な増殖を刺激するリン酸カルシウムセラミックスを意味する。しかしながら、骨増殖の組織学的および臨床的に検出可能な刺激が生じるまで、担体マトリックスの「生体活性」は存在しない。リン酸三カルシウム、特に、 β -TCP更にまた α -TCPをベースとした本発明の多孔性生体活性担体マトリックス(例えば、Cerasorb®)を用いた臨床経験が得られている。相純粋な開放マイクロ細

孔型 β -TCP (phase-pure and open microporous β -TCP) は、生体活性および骨形成誘発性がずば抜けて高く、骨貯蔵部において予測する化学的分解の結果と

して単独でイオン環境を生成し、これが骨芽細胞活性の刺激に寄与し、in situで基質として作用して骨芽細胞を活性化する。骨形成の初期段階(網状骨段階)で担体マトリックスの化学的分解と吸収とが同時に起こった場合、周囲の骨貯蔵部の強度および構造を回復する優れた機会となる。このための前提条件は、非生理的に反応することの多い非化学量論的な第2の相が存在しないことである。このことは、相純粋な β -TCPに対して実証することができる。つまり、この物質は単独で既に骨形成誘発作用を有している。体積の20~60%の範囲が連続マイクロ細孔である結晶学的に相純粋な α -または β -リン酸三カルシウムセラミックスは特に好ましい。特に好ましい実施態様において、結晶学的に相純粋な α -または β -リン酸三カルシウムセラミックスの一次粒子サイズは、10~40 μ mの範囲である。本発明の更に好ましい実施態様において、この移植体材料は、注入可能な懸濁液の形態で存在する。これにより、例えば、浸潤を最小限に抑えてこの材料を適用できる。従って、水、血清、血漿、および血液のような医療用として好適な液体中にこの材料を懸濁すれば、移植体中への巨大細胞または結合組織の浸潤は起こらない。

従って、本発明の重要な課題は、2つの成分AおよびBを含み、成分Aの骨形成作用が成分Bの骨形成誘発作用により相乗的に増幅される移植体材料である。

従って、この複合体は、2つの成分(すなわち、軟骨誘導性および／または硬骨誘導性のタンパク質またはタンパク質混合物と骨形成誘発担体マトリックス)の作用機構の有利な組合せに基づくものである。本発明のこのような移植体材料では、タンパク質Aの骨形成作用に対抗した増殖作用(生体適合性はあるが生体活性はない移植体材料の中にはこうした作用を呈するものがある)が回避される。この場合、HAのような担体材料は、生分解が遅いため、タンパク質刺激骨合成に応用するのに適していないことが多い。リン酸塩ガラス、ならびにCaPの準安定相または相混合物、更にまた例えば珊瑚から得られる化学的改質マトリックスの準安定相または相混合物のような迅速な生分解が可能な担体セラミックスは既にそれ単独で、マクロファージまたは／および破骨細胞の活性化が原因となって、タンパク質刺激骨合成に対抗した増殖作用を示す。更に、好適な担体材料のマトリックス表面をコラーゲンのような生理学的に不活性なタンパク質充填剤でコーテ

ィングすると、吸収に対する抑制作用を示すこと、従って、生体活性に対する抑制作用を示すことが判明した。驚くべきことに、マイクロ細孔型の相純粋なTCP(好ましくは β -TCP)をベースとした担体材料と、赤色骨髄または血液のホモジネートとの混合物では、マトリックス表面がタンパク質でかなり被覆された場合でも、骨合成が促進されることが分かった。従って、本発明の移植体材料では、これらの結果が最適化されている。成分Aであるタンパク質またはDNAによるマトリックスの被覆を最小限に抑えた場合、連続マイクロ細孔構造を介して必然的に成分Aを放出しかつ移植部位におけるマトリックスの化学的分解に対応する程度に生物学的に活性である担体マトリックスBの生体活性、すなわち、固有の骨形成誘発性が保持される。適切なマトリックスとの併用を行わなかった場合、代謝、体液による輸送、または食作用が原因となって、骨形成タンパク質Aだけが移植部位においてその生物学的活性を迅速に失うであろう。所定のマイクロ細孔構造を有する担体マトリックスの相純度によって予測可能な吸収が保証され、更にまた、タンパク質成分AまたはそれをコードするDNAの制御放出が保証される。マトリックスBとタンパク質Aとのこうした相互作用によって、2つの成分Aおよ

びBの作用が相乗的に増幅されることは疑いのないことである。

本発明の更なる課題は、タンパク質AまたはDNAを含有する生理学的に許容しうる水混和性溶剤または適切な溶剤混合物の溶液を、成分Aがマトリックスのマイクロ細孔構造の中および／または上に均一に分布するように生体適合性マトリックスBのマイクロ細孔構造に適用することを特徴とする本発明の移植体材料の製造方法である。

TGF- β スーパーファミリーのタンパク質の産生、好適な宿主細胞中におけるそれらの発現、および精製に関する情報は、先に引用した多数の出版物および特許資料中に記載されている。特に、MP52/GDF-5またはその活性断片の調製に関する参考文献としては、WO 95/04819号およびDE 19525416.3号ならびにHotten et al., (Growth Factors 13 (1996) 65-74)が挙げられる。

MP52の場合のようにタンパク質が封入体の形態で存在する細菌中でタンパク質を産生する場合、タンパク質(例えば、MP52)が活性形態で得られるように既知の方法でタンパク質を復元する。E. coli中で発現されたMP52様タンパク質は、

活性タンパク質の形態に再生することができる(Krieglstein, K. et al., J. Neuroscience Res. 42 (1995) 724-732)。また、正確な手順については、特願平7('95)-93664号およびDE 19525416.3号に記載されている。本発明者およびRuppert, R.ら(Eur. J. Biochem. 237, 295-302(1996))による他の研究から、例えば、BMP-2をE. coli中で発現し、二量体を形成するように再生できることが分かっている。

DNAは、例えば、Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel et al., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, Wiley & Sons, 1987-1996)またはMolecular Cloning(Sambrook et al., 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989)に記載されているような当業者に公知の方法により調製される。

独国特許DE 38 10 803 C2号に記載の次の手順を用いて担体マトリックスBを調製することができる。CaCO₃とCaHPO₄との均質な化学量論的混合物を、CaOおよびP₂O₅系の構成図(状態図)(Tromel, Stahl und Eisen 63 (1943) 21; Welch, J.

Chem. Soc. (1961)4442)に従って、圧縮成形体の形態でいくつかの工程を踏んで1350℃までの焼結温度で処理した。この処理では、焼結系から水およびCO₂が除去される。焼結プロセス間で、焼結合成の中間段階物を、微粉碎、超微粉碎、再圧縮の処理にかけて成形物を製造するか、またはペレット化して粒状物を製造する。焼結プロセスは、状態図に従ってTCPの共存隣接相(すなわち、特に、リン酸四カルシウムやリン酸二カルシウムの相)を回避すべく、時間および温度を調節して行われる。熱力学的に安定な β -Ca₃(PO₄)₂または β -TCPの準安定相については、目的とする用途に応じて焼結プロセスを調節することにより特に回避するか、または意図的に共存させるか、あるいは更に、主要生成物として単独で調製することが可能である。

担体マトリックスBの細孔構造中に成分Aを均一に導入および分布するには、成分自体を変化させることなくこうした分布を可能にするいくつかのタイプのプロセスが必要である。

従って、処理温度が高いため、セラミックスの焼結プロセスにおいて、AとBとを組み合わせると同時に使用することができないことは明らかである。

これとは対照的に、本発明に係るタンパク質AまたはそれをコードするDNAを適切な溶剤に溶解してなる溶液を成形物および粒状粒子の多孔質セラミックス

構造に浸透させることが可能である。この場合には、開放セラミックス構造の毛管力が効果的に働くようになる。もちろん、溶剤を選択する際は、生体材料の成分AおよびBの特性を変化させないものだけが考慮の対象となる。従って、例えば、酸性溶剤は、骨形成タンパク質に対しては優れた溶剤であるが、リン酸カルシウムを攻撃して化学的に改質するため、不適當である。一方、水は、セラミックスに対しては問題ないが、タンパク質成分Aの溶解が不完全になる可能性が高い。懸濁液を用いて浸透させる場合、マイクロ細孔構造が原因で、担体マトリックス中に均一に分布させることはできないであろう。

エバポレーションによって明らかに除去可能な溶剤相を用いて担体マトリックスに浸透させる方法においても、同様に、Bの中にAを完全に均一に分布させることはできない。なぜなら、多孔質セラミックスの表面から溶剤をエバポレート

するときに、溶解相が内部から外部へ物質移動を起こし、表面に濃縮されるからである。

担体マトリックスに成分Aを均一に付与するというこの複雑な課題に対する解決策は、本発明に従って次のタイプの方法を実施することによって得られる。

ー 穏やかに加熱されたタンパク質Aの飽和溶液を冷却した後、溶剤を除去する方法。その結果、溶剤中のタンパク質Aの溶解度の限界を超え、タンパク質が担体構造中に堆積する。このため、残存溶液中のタンパク質の量が減少し、これに対応して上記の濃度の影響も低減する。温度範囲が狭いので、この方法には当然のことながら限界がある。しかし、骨形成作用に対する所定の開始効果を得るうえで、セラミックス構造中のタンパク質の量の勾配が所望のものである場合には、特に適切な方法である。

ー 有機溶剤および／または水を含むタンパク質含有またはDNA含有液体混合物を、臨界点乾燥により昇華させて除去する方法。固化された溶剤混合物から気体状態に直接転移させるため、液体相を介したタンパク質またはDNAの移動は防止され、その結果、セラミックス構造中に沈殿したタンパク質またはDNAは均一に分布することになる。

ー 例えば水を添加してタンパク質を急速に沈殿させることにより、従って、*in situ*でセラミックス構造中に堆積させることにより、タンパク質含有有機溶

剤からセラミックス担体構造中にタンパク質を均一に沈殿させる方法。この方法は、いろいろな形で利用できる。また、タンパク質は有機溶剤に溶解し、この純溶剤は水と混和するがタンパク質含有溶液は水と混和しないように物質を組合せて行われる。この目的に対しては特に、アセトニトリル／水、プロパンジオール-1,2／水、またはプロパノール／水を利用することができる。

ー 無水エタノールのようなアルコール溶液を添加してセラミックス構造中にDNAを急速に沈殿させることにより、DNA含有塩溶液(例えば、0.1M NaCl または0.25M NaAc)からセラミックス担体構造中にDNAを均一に沈殿させる方法。必要であれば、ドーブ処理された担体マトリックスを70%エタノー

ルで洗浄してもよい。

本発明に係る移植体材料の有効性は、従来の試験系、例えば、先に述べたラット、イヌ、ウサギ、または霊長類動物のモデル系で試験することができる。

従つて、本発明の更なる課題は、場合により、薬剤学的にも生理学的にも許容しうる補助物質、希釈剤、および／または充填剤と共に、移植体材料を含んでなる医薬組成物であり、更にまた、脊椎動物、特にヒトのような哺乳動物において、軟骨および／または硬骨の疾患の局所治療、および／または怪我、手術、退化、または過労によって生じる軟骨および／または硬骨組織に対する損傷の局所治療を行うために、場合により、薬剤学的にも生理学的にも許容しうる補助物質、希釈剤、および／または充填剤と共に、医薬として有効な濃度で本発明に係る複合体を使用することである。

本発明に係る複合体は、特に、例えば、年齢、代謝性疾患、または炎症性突起によって生じる骨欠損に関連した疾患を治療するために使用することができる。

軟骨または骨組織に対する損傷は、怪我(例えば、スポーツによる怪我)、事故、運動器官の使用過多の後で生じるか、または手術の結果として(例えば、人工固定具用のネジを除去した後に骨に残るドリルの孔により、または腫瘍組織の切除の後で)生じる可能性がある。骨折の特異的局所治療は特に好ましい。また、肢の伸長を行うこともできる。歯周病の治療、顎域におけるサイナスリフト(sin us lift)または嚢胞充填など、歯または顎域における利用は、特に興味深い。また、美容外科、特に、顔面域における形成外科でも利用される。本発明に係る複合体

はまた、2つの可動骨部分の固定に利用できる。例えば、新しく形成された架橋骨により2つの椎骨の結合を行うことができ、例えば、椎間板の障害に有利に利用することができる。こうした治療法は、獣医学にも適用される。

用量は、タンパク質成分のタイプおよび用途、患者の疾患および症状により、 $10\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$ の範囲である。担体マトリックスの量は、治療対象となる骨または軟骨の欠陥の大きさに依存する。

プレスされた大きな担体マトリックスを使用する場合、例えば、スチールロツ

ドおよびネジにより、これらを機械的に固定しなければならない。

複合体中の2つの成分(すなわち、軟骨誘導性および／または硬骨誘導性のタンパク質と骨形成誘発性担体マトリックス)の作用機構が組み合わさって達成される本発明の根幹をなす相乗効果によって、治療において非常に良好な結果を得ることができる。

本発明に係る移植体材料の利点は、軟骨誘導反応および／または硬骨誘導反応を必要とする治療プロセスを実質的に改良および促進できることである。こうした利点のおかげで、患者が疾患を患う期間は著しく短縮され、不就労期間も短くなり、更に入院費用も低減する。更なる経済的側面としては、蔓延している疾患である歯周病(歯の早期脱落を伴う)を効果的に治療できることが挙げられる。従って、費用のかかる早期義歯とは対照的に、歯周病の治療により経済的な歯の保護が可能になる。

図面の簡単な説明を以下に記す。

配列番号1は、ヒトTGF- β タンパク質MP52の前駆体タンパク質の完全アミノ酸配列を示している。成熟タンパク質の開始点は、好ましくは、アミノ酸361~400の領域、特に好ましくはアミノ酸381または382の位置にある。タンパク質の成熟部分は、位置400、429、433、465、466、498、および500に7個の保存システインを含有する。

図1および2は、本発明に係る担体マトリックスの骨形成誘発活性を、生体適合性はあるが生体活性はないマトリックスと比較して示している。図1は、生体不活性なマトリックス、例えば、Al₂O₃(図1の1)の細孔中における骨形成を模式的に示している。図2は、本発明に係るリン酸カルシウムマトリックス(図2の1)の

骨形成誘発作用を、これ以外は同じ移植体条件下で比較したものである。

いずれの場合においても、全体にわたり開放マクロ細孔(細孔直径約0.5~0.7mm ϕ)を有する円筒形の移植体(1)(外径6mm)を小さな骨(イヌの脛骨)中に移植した。はつきりと観察できるラメラ構造を有する小さな貯蔵骨(2)は、短い移植時間の後、移植体の周辺に新しい骨を形成し、骨中のドリル孔と移植体(3)の外縁との間の中間スペースを架橋しようとする。更に、新しい骨は、移植体の細孔中に

も生成する(図1の4aおよび図2の4b)。

2つの移植体材料の有意な差異は、骨形成誘発性移植体材料(図2の4b)では、細孔の内側表面上に直ちにかつ自然発生的に骨が形成されること、核形成部位として担体マトリックスが使用されていること、およびその部位から移植体の全領域にわたり該マトリックスで満たされていることである。これとは対照的に、非生体活性材料(図1)では、細孔の中間部分を通して骨が非常にゆっくりと増殖し、移植体材料との直接的な接触は永久に起こらない。これらの差異の結果として、骨形成誘発性材料の場合には(図2)、非常に強力かつ迅速な複合体形成が行われ、破骨活性を伴う生体不活性な材料の場合には(図1)、遅く不完全な形成が行われる。

配列表

配列番号1の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 配列の長さ: 501アミノ酸

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: タンパク質

(xi) 配列:

Met Arg Leu Pro Lys Leu Leu Thr Phe Leu Leu Trp Tyr Leu Ala Trp
 1 5 10 15

Leu Asp Leu Glu Phe Ile Cys Thr Val Leu Gly Ala Pro Asp Leu Gly
 20 25 30

Gln Arg Pro Gln Gly Thr Arg Pro Gly Leu Ala Lys Ala Glu Ala Lys
 35 40 45

Glu Arg Pro Pro Leu Ala Arg Asn Val Phe Arg Pro Gly Gly His Ser
 50 55 60

Tyr Gly Gly Gly Ala Thr Asn Ala Asn Ala Arg Ala Lys Gly Gly Thr
 65 70 75 80

Gly Gln Thr Gly Gly Leu Thr Gln Pro Lys Lys Asp Glu Pro Lys Lys
 85 90 95

Leu Pro Pro Arg Pro Gly Gly Pro Glu Pro Lys Pro Gly His Pro Pro
 100 105 110

Gln Thr Arg Gln Ala Thr Ala Arg Thr Val Thr Pro Lys Gly Gln Leu
 115 120 125

Pro Gly Gly Lys Ala Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe
130 135 140

Leu Leu Lys Lys Ala Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu
145 150 155 160

Pro Phe Arg Pro Pro Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu
165 170 175

Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val
180 185 190

Lys Leu Glu Ala Gly Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys
195 200 205

Gly Gln Asp Asp Arg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe
210 215 220

Asp Ile Ser Ala Leu Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg
225 230 235 240

Ile Leu Arg Lys Lys Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly
245 250 255

Gly Gly Arg Ala Ala Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg
260 265 270

Gln Pro Ala Ser Leu Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly
275 280 285

Ser Gly Trp Glu Val Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys
290 295 300

Asn Ser Ala Gln Leu Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg
305 310 315 320

Ala Val Asp Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val
325 330 335

His Glu Lys Ala Leu Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Lys Arg Asp
340 345 350

Leu Phe Phe Asn Glu Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr
 355 360 365

Val Tyr Glu Tyr Leu Phe Ser Gln Arg Arg Lys Arg Arg Ala Pro Leu
 370 375 380

Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys
 385 390 395 400

Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp
 405 410 415

Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu
 420 425 430

Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His Ala Val
 435 440 445

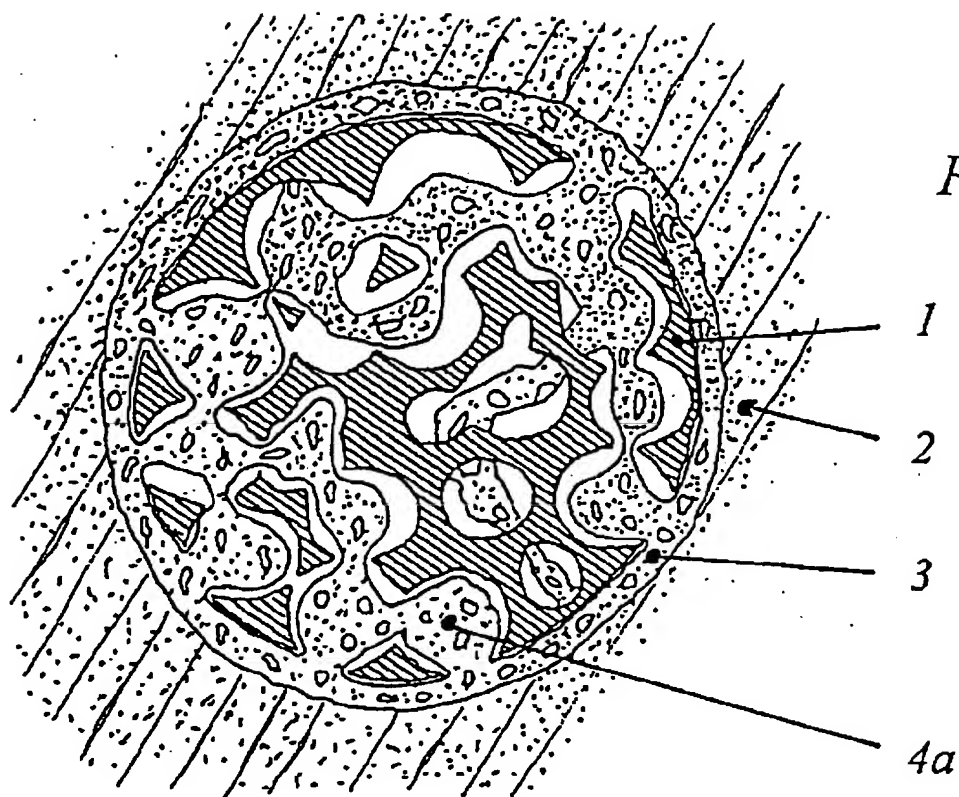
Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro Pro Thr
 450 455 460

Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp
 465 470 475 480

Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu
 485 490 495

Ser Cys Gly Cys Arg
 500

【図1】



【 図 2 】

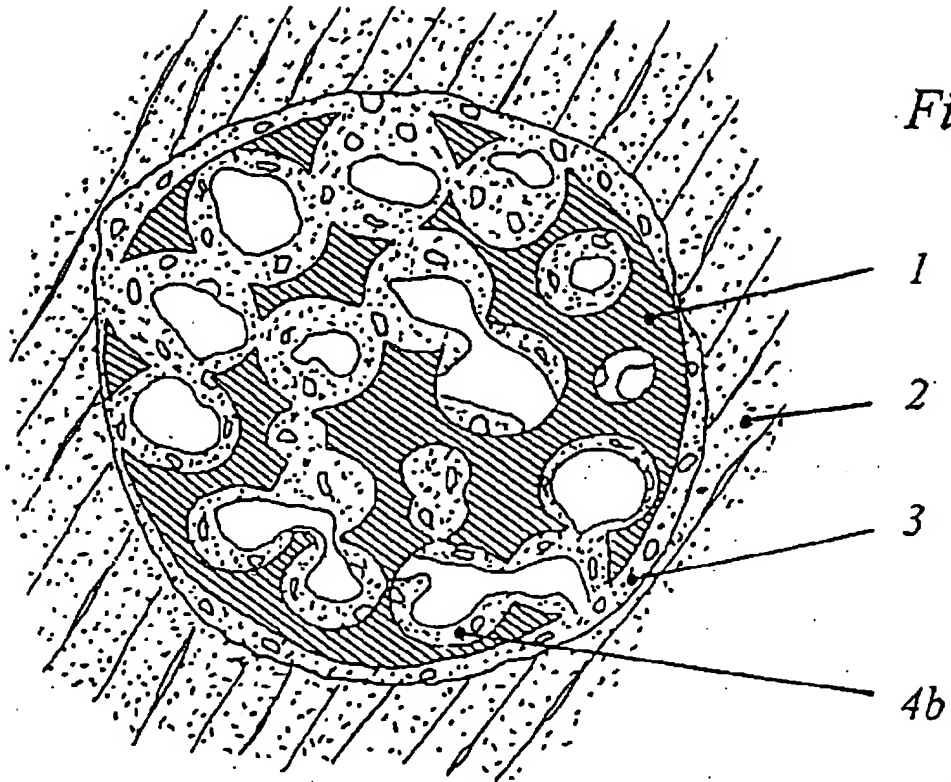


Fig. 2

【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 97/06463

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61L27/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| Y | WO 95 04819 A (BIOPH BIOTECH ENTW PHARM GMBH) 16 February 1995 cited in the application see page 36 see claims 1,5,6,8,9 --- | 1-3,8-13 |
| Y | US 4 596 574 A (URIST MARSHALL R) 24 June 1986 see column 3, line 45 - column 4, line 30 see example 1 see claims 1,5-8 --- | 1-3,8-13 |
| A | US 4 681 763 A (NATHANSON MARK A ET AL) 21 July 1987 see column 1, line 48 - column 2, line 62 --- -/-- | 10 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

* "E" earlier document but published on or after the international filing date

* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

* "Z" documents member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 July 1998

Date of making of the international search report

30/07/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heck, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 97/06463

| C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|-----------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | DE 38 10 803 A (BATTELLE INSTITUT E V) 12 October 1989 see example 1 ----- | 4,5,7. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/06463

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---|---------------------|--|--|
| WO 9504819 | A | 16-02-1995 | DE 4420157 A AU 688362 B AU 7498694 A CA 2169171 A CN 1129013 A CZ 9600357 A EP 0713529 A HU 74271 A JP 9501053 T NZ 271376 A ZA 9405992 A | 23-02-1995 12-03-1998 28-02-1995 16-02-1995 14-08-1996 17-07-1996 29-05-1996 28-11-1996 04-02-1997 24-04-1997 14-03-1995 |
| US 4596574 | A | 24-06-1986 | NONE | |
| US 4681763 | A | 21-07-1987 | NONE | |
| DE 3810803 | A | 12-10-1989 | NONE | |

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 パウリスタ, ミヒャエル
ドイツ連邦共和国 ディー—69181 レイ
メン, ヴィンガーシュトラッセ 10

(72)発明者 ポール, ジェンス
ドイツ連邦共和国 ディー—76707 ハン
ブルーケン, ケラーヴィエセン 3

(72)発明者 バブスト, ジョアキム
ドイツ連邦共和国 ディー—64354 ライ
ンハイム, ロスベルグリング 107

(72)発明者 ハイデ, ヘルムート
ドイツ連邦共和国 ディー—65779 ケル
クハイム, アン ホーヘンスタイン 14

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.